抗体的固定化方法研究进展*

杜 凯 张卓玲 李婷华 饶 微**

（深圳市新产业生物医学工程股份有限公司，深圳 518118）

摘要 在免疫分析和生物芯片中，抗原-抗体特异性结合被广泛应用，其中抗体的固定化是研发高效诊断和分离工具的关键环节.生物分子工程、材料化学与交联剂化学的进步极大地促进了抗体固定化技术的发展. 抗体可以通过物理吸附、共价偶联和亲和相互作用固定到不同类型的固相表面. 抗体固定化的目标是以一种正确的空间取向将抗体固定到固相表面，在完全保留抗体构象和活性的同时最大化抗原的结合能力，这对固相化抗体的分析性能至关重要. 本文对固定抗体到固相载体表面的各种最新方法进行了阐述，包括物理吸附法，通过羧基、氨基、巯基、糖基和点击化学的共价结合法以及基于生物亲和作用的固定法，并对固定化抗体的表征方法进行了归纳，最后对抗体固定化方法的发展方向进行了展望.

关键词 抗体 固定化 免疫分析

学科分类号 Q511，O629.7

The Research Progress of Antibody Immobilization*

DU Kai, ZHANG Zhuo-Ling, LI Ting-Hua, RAO Wei**

（Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd., Shenzhen 518118, China）

Abstract The antigen-antibody specific binding reaction is widely used in immunoassays and biochips in which antibody immobilization play a key role in the development of efficient diagnostics and separation tools. Progress in the field of biomolecular engineering, material chemistry and crosslinker chemistry have greatly promoted the development of antibody immobilization techniques. Antibody can be immobilized on different types of solid-phase surfaces by physical adsorption, covalent attachment and affinity-based interaction. The aim of antibody immobilization is to full retain antibody comformation and activity while maximize the antigen binding capacities by immobilizing antibody to the surface in the right orientation which is critical to the analytical performance. This paper reviews the most recent methods for immobilization of antibody on solid-phase surface, including physical adsorption, covalent binding through carboxyl, amine, thiol, carbohydrates as well as click

* 深圳市战略新兴产业发展专项资金（JSGG20160225150949068）资助项目

**通讯联系人.

Tel: 0755-28292700 , E-mail: raowei@snibe.cn

* This work was supported by a grant from Special Funds for The Development of Strategic Emerging Industries in Shenzhen City (JSGG20160225150949068)

**Corresponding author. Tel: 0755-28292700, E-mail: raowei@snibe.cn

chemistries, and through bioaffinity techniques. The characterization methods for the investigation of immobilized antibodies are summarized. In addition, future perspectives for methods of antibody immobilization are also discussed.

Key Words antibody immobilization immunoassays

1 引言

免疫分析、蛋白芯片和生物传感器技术由于其灵敏度高、成本低、通量大等优势，已经被广泛用于临床诊断、药物筛选、食品检测和环境保护等领域[1-3]. 这些技术中最为核心的成分是用于识别靶标的抗体，在应用中通常需要将抗体连接到固相表面形成固定化抗体，抗体在固相表面的密度、空间构象、抗原结合位点的取向等因素则对其抗原捕获能力有关键的影响，从而决定分析的灵敏度.

抗体通常是分子量大约为 150 kDa 的免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G，IgG），其分子三维大小约为 14×10×4 nm，含有两个 Fab 片段和一个 Fc 片段，两个 Fab 片段由铰链区的二硫键结合在一起形成 $F(ab')_2$ 片段[4]. 不同抗体的 Fab 片段其氨基酸组成、等电点以及物理结构均有较大差异，这对抗体在固相表面的取向起决定作用. 在理想状态下，固定的抗体应保持天然构象，Fc 片段朝向固相表面，Fab 片段则暴露于液相中，相邻的抗体分子之间不存在抗原结合的空间位阻，以此最大化抗原的结合能力. 但是通常在随机固定的抗体中会有不同的空间取向，使得抗体丧失了部分的活性（图 1）[5].

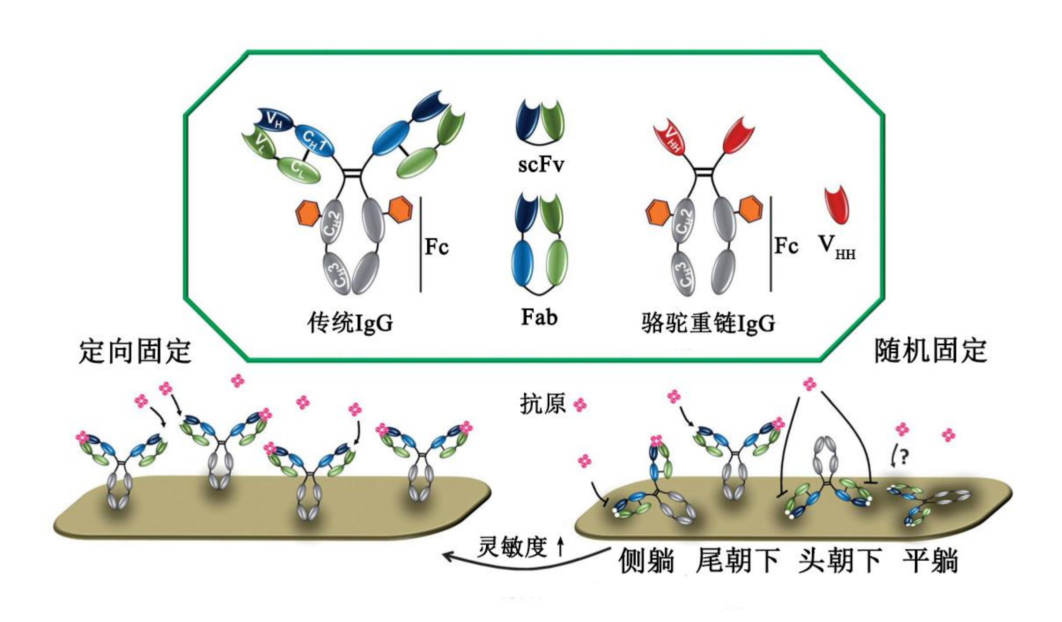


图 1 抗体的结构及固定化抗体的空间取向[5]

Fig. 1 Structure of antibodies and the orientation of immobilized antibodies

近年来，随着对分析方法灵敏度要求的不断提高，抗体的固定化研究也取得了很大的进展. 研究人员主要从两个方面对抗体的固定方法进行不断改进：一是对固相材料本身进行化学改性，降低其非特异性吸附；二是对固定方法进行改进，使抗体在表面的固定具有更强的定向性和有序性.

2 抗体固定化方法

2.1. 物理吸附

物理吸附是指通过离子键、静电作用、疏水力以及极性相互作用等非共价形式固定至固相表面，是目前最简单的抗体固定方法. 物理吸附的优点是反应简单，快速且不需要添加偶联试剂或对目标抗体进行修饰，但有以下缺陷：a. 不可控制抗体偶联的定向性，抗体吸附至固相表面的随机性强，可能会屏蔽其结合位点使抗原结合活性下降；b. 不能控制固定抗体的密度从而产生空间位阻；c. 物理吸附结合力相对较弱，在后续应用时抗体可能发生解吸附.

常用于固定抗体的固相材料包括塑料（聚苯乙烯和硅树脂[6]），膜（硝酸纤维素膜[7]和尼龙[8]）和金属表面[9]. 其中聚苯乙烯是最广泛应用于酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）的固相载体[10]. 为了改善物理吸附的负面影响，许多研究者通过对固相载体进行修饰从而提高其亲水性及生物相容性. Wang 等[11]从灰树花中提取疏水蛋白对聚苯乙烯表面进行修饰，并通过癌胚抗原的时间分辨免疫荧光测定来评价疏水蛋白改性的聚苯乙烯对抗体的吸附性能，疏水蛋白可在聚苯乙烯表面自组装形成 10 nm 厚的两亲性膜，疏水部分与聚苯乙烯结合，亲水部分与抗体结合；结果表明，两亲性膜不仅可增加聚苯乙烯的亲水性，还可以通过静电作用固定抗体；修饰后的聚苯乙烯对癌胚抗原的检测范围为 5-600 ng/mL，相对于未修饰的聚苯乙烯具有更高的灵敏度和更低的非特异性吸附.

Xu 等[12]使用原子力显微镜（Atomic force microscopy，AFM）和中子反射（Neutron reflectometry，NR）研究在亲水性二氧化硅/水界面处的小鼠抗人绒毛膜促性腺激素β单位单克隆抗体的构象取向，发现抗体主要以“平躺”的方式与表面结合，即 Fc 端与 Fab 端均平躺在表面上，AFM 成像进一步显示相邻的抗体分子由于相互作用在表面形成了不均匀的聚集体.

Żeliszewska 等[13]通过多普勒激光测速电泳迁移率测量法和 AFM 测定蛋白质最大的覆盖度来研究单克隆 IgG 吸附在带负电荷聚苯乙烯微球表面的机制，研究表明 IgG 吸附到聚苯乙烯微球上是不可逆的，pH 在 3.5~10 之间包覆的 IgG 结构是稳定的，IgG 最大的覆盖率在 2.1~3.4 mg m^{-2}；证实 IgG 抗体与白蛋白分子比较，对聚苯乙烯具有更高的亲和力，因此在 pH7.4 下使用白蛋白作为封闭剂的效果可以忽略，封闭步骤可省略，该结果证明 IgG 抗体与白蛋白分子比较，对聚苯乙烯具有更高的亲和力.

2.2. 通过抗体-COOH，-NH_2的抗体固定化

共价偶联可改善物理吸附的不足之处，减小抗体固定过程的随机性并增强固定抗体的稳定性. 组成抗体的 20 种天然氨基酸中，只有赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等很少几种氨基酸的侧链可用于共价偶联，而对于其他氨基酸则由于包埋在抗体内部不可接近、反应性弱或不可控而很少用于偶联. 除侧链的ε-氨基外，N 末端的α-氨基和 C 末端的羧基也具有较强的反应活性. 一个典型的 IgG 分子上大约含有 120 个赖氨酸残基可用于偶联.

目前最为广泛应用于羧基和氨基的偶联剂为 1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺（1-(3-DiMethylaMinopropyl)-3-ethylcarbodiiMide，EDC）[14, 15]和 1-环已基-2-吗啉乙基碳二亚胺（1-cyclohexyl-3-(2-(4-morpholinyl)ethyl)carbodiimide，CMC）[16]，它们可单独使用，一步法直接将抗体固定到羧基或氨基的固相表面. 也可以用两步法，先将 EDC（或 CMC）与 N-羟基琥珀酰亚胺（N-Hydroxysuccinimide，NHS）联合使用，将固相的羧基活化成 NHS 活化酯，然

后与抗体的氨基形成酰胺键. 两步法常优于一步法的原因在于两步法得到的 NHS 更稳定且活化效率高，同时不会造成一步法可能造成的抗体自身交联.

Sam 等[17]对 EDC/NHS 活化羧基表面进行了深入的研究，首先羧基与 EDC 反应生成不稳定的 O-酰基脲中间体，接下来 O-酰基脲中间体有三种反应途径—与 NHS 进一步反应生成相对稳定的 NHS 活化酯，或与邻近的羧基反应生成酸酐，或分子内发生酰基迁移重排生成 N-酰基脲，此外生成的酸酐也可以与进一步反应 NHS 生成一分子的活化酯和一分子的羧酸（图 2）. 单纯通过酸酐途径产生的 NHS 活化酯效率不高，只有在 EDC 和 NHS 的浓度在特定的范围时才能使羧基活化基本完全.

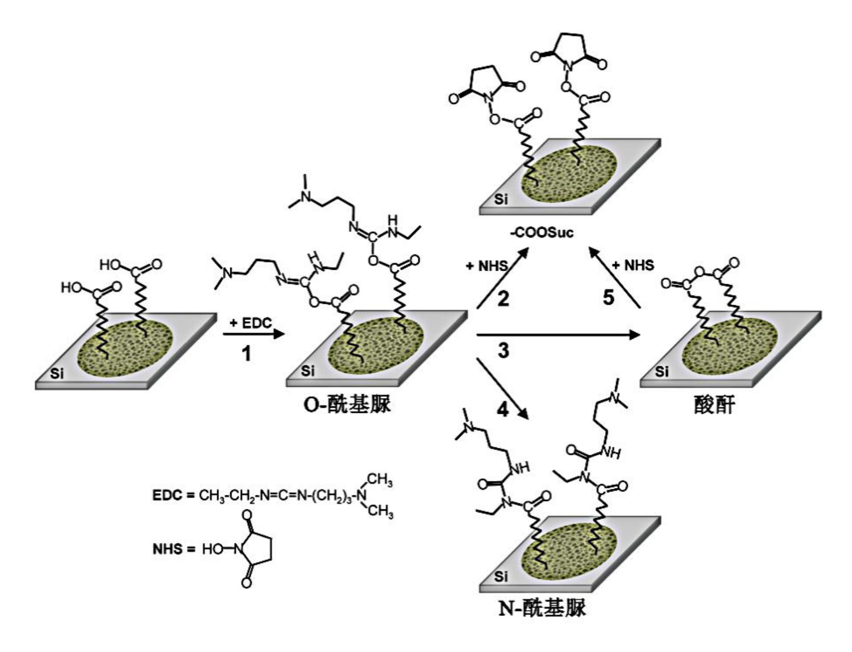


图 2 EDC/NHS 活化羧基表面的反应机理[17]

Fig. 2 Reaction mechanism of carboxylated surface activated by EDC/NHS

有研究表明并不是 EDC/NHS 两步法一定优于 EDC 一步法，Vashist[18]研究 3-氨基丙基三乙氧基硅烷（APTES）修饰金芯片和 96 孔板表面，与抗人胎球蛋白 A（HFA）偶联，单独使用 EDC，与 NHS 或 sulfo-NHS 组合使用，并用表面等离子共振（Surface plasmon resonance，SPR）免疫测定和夹心 ELISA 作比较，结果表明 EDC 在 pH7.4 下比 EDC/NHS 和 EDC/sulfo-NHS 更有效地将抗 HFA 抗体与 APTES 官能化的固相表面交联. Raghav 等[19]使用三种策略固定 CA125 抗体：①用 EDC/NHS 活化柠檬酸盐包覆金纳米颗粒（cit-AuNPs）；②直接在 cit-AuNPs 上进行物理吸附；③直接在 L-天冬酰胺包覆的 cit-AuNPs 上进行物理吸附，结果显示第三种方案比其他两种方法有更高的灵敏度，且氨基酸包覆 cit-AuNPs 确保定向固定，较少随机化.

将氨基与抗体偶联的另一种常用的交联剂为戊二醛[20]. Gunda 等[21]使用 APTES 包覆在硅基地表面形成稳定的硅烷层，再经过戊二醛处理接上醛基接头，与抗体进行偶联.夹心免疫测定结果显示硅烷的包覆层有助于增加固相表面上生物分子的密度，进一步提高免疫测定的灵敏度.

基于氨基和羧基的抗体固定随机性较强，有时在 Fab 片段抗原结合区域附近会有反应性较

强的氨基或羧基，此时通过氨基或羧基的固定方式容易造成抗体的失活.

2.3. 通过-SH 对抗体进行定向偶联

半胱氨酸是唯一拥有侧链巯基的天然氨基酸，在蛋白质中平均含量小于 1% [22-24]，但在 IgG 分子中，游离巯基是极为罕见的.半胱氨酸的侧链巯基通常以二硫键的形式包埋在蛋白质三维结构的内部，利用二硫苏糖醇（DTT）、巯基乙醇、三（2-羧乙基）膦等还原抗体铰链区的二硫键可以生成游离巯基[25-29]. 巯基的 pK_a 在 8.5 左右，在中性和酸性条件下表现亲核性，可以通过表面含有α-乙酰卤或者马来酰亚胺基团的固相表面进行定向固定[30, 31]，得到的固相抗体在水溶液中可以稳定保存[32].

最常用的乙酰卤衍生物是包含碘乙酰基的复合物，碘乙酰基可以通过对称酸酐结构连接到含有氨基的微粒上，使固相表面的末端基团由氨基转换为碘乙酸基团，随后和抗体上的巯基基团进行定向偶联[33]. 碘乙酰基在 pH 7.0 能与抗体中的组氨酸侧链或末端氨基反应，但通过控制反应物含量和 pH，可以使抗体的巯基成为唯一反应基团[34].

马来酰亚胺的双键在 pH 6.5-7.5 的范围和巯基有很高的反应活性. 利用同型或者异型双功能交联剂，可以将固相表面末端的氨基或者羧基转化为马来酰亚胺基团[35]；在合成固相颗粒时也可以直接在颗粒上包被末端含有马来酰亚胺的聚合物，用来和抗体的巯基偶联[36].

除了上述常见的反应外，巯基还可以和氮丙环开环亲核加成反应形成偶联. Giulia Tuci 等[37]报道合成了表面为氮丙环的多壁碳纳米管（multi-walled carbon nanotubes，MWCNTs），将叠氮甲酸叔丁酯加入到含有 MWCNTs 的邻二氯苯溶液中，通过[2+1]环加成反应，生成叔丁氧羰基（t-Butyloxy carbonyl，BOC）—多壁碳纳米管（$MW@N^{BOC}$）中间结构，随后在动态超高真空控制下热处理 12 小时，使 $MW@N^{BOC}$ 生成表面为氮丙环的多壁碳纳米管（$MW@N^{Az}$），反应终产物 $MW@N^{Az}$ 保存在氮气环境中更加稳定. 这使通过表面为氮丙环的固相对抗体巯基进行定向偶联成为可能.

2.4. 点击化学用于抗体固定化

点击化学是 2001 年由美国化学家 Sharpless 提出的合成概念[38]，其中以叠氮化物和炔烃的 1,3-偶极环加成反应生成 1,2,3-三唑最具有代表性. 该反应条件温和，产率高，近年来在蛋白尤其是抗体的固定化中应用逐渐增多.

Finetti 等[39]用该方法合成了偶联羊抗鼠 IgG 的金纳米粒，具体过程为：首先在制备的金纳米粒表面生长一层极薄的 SiO_2 层，然后用聚（DMA-PMA-MAPS）包覆，聚合物侧链上含有炔烃；然后用 azido-PEG_8-NHS 修饰 IgG 引入叠氮基，最后将聚合物包覆的金纳米粒和修饰的 IgG 在 $CuSO_4$/三（3-羟丙基三唑基甲基）胺/L-抗坏血酸的辅助下发生点击反应.

1,3-偶极环加成反应分为 Cu(I)催化的反应和无催化剂两种类型，由于 Cu(I)可能对某些敏感的蛋白具有损害作用，因此对于涉及蛋白的反应人们更多采取的是无催化剂的环加成，例如环张力驱动的环加成（strain-promoted azide-alkyne cycloaddition，SPAAC），此时炔烃为具有较高环张力的环炔烃，如环辛炔.

Beekwilder 等[40]采用骆驼重链抗体可变区（VHH）构建了一种 SPR 生物传感器用于口蹄

疫病毒的检测，在基因重组的 VHH 的 C-末端引入侧链带有叠氮基的丙氨酸，将传感器芯片表面的羧甲基葡聚糖修饰末端含有炔烃的 PEG 衍生物，VHH 和葡聚糖通过点击反应键合在一起.

2.5. 利用糖基固定化

通常情况下，抗体的 Fc 端均有不同程度的糖基化修饰，Fc 端远离抗体的抗原结合区域 Fab，通过 Fc 端进行抗体固定能够使抗体获得更好的空间取向，保留更多的抗原结合能力. 利用糖基固定化抗体的方法主要有高碘酸钠氧化法及亚硼酸连接法.

2.5.1. 高碘酸钠氧化法

利用高碘酸钠氧化糖基的顺式二醇产生游离醛基，然后固定到氨基或酰肼表面. 高碘酸钠氧化顺式二醇产生醛基的关键点在于抗体氧化程度的控制，氧化程度不足会导致引入的醛基数量少，影响后续的反应，氧化过度会导致形成羧基而不是醛基，而且会修饰抗体的其他氨基酸残基而使抗体部分失活. Wolfe 等[41]以多克隆兔 IgG 为模型，研究了高碘酸钠在醋酸盐缓冲液中对 IgG 的氧化反应，发现控制高碘酸钠浓度、pH、温度和时间，可以精确控制 IgG 上修饰的醛基数量. IgG 上引入醛基以后，可以和氨基形成席夫碱，席夫碱不稳定，需要用 $NaBH_4$ 或者 $NaCNBH_3$ 还原成稳定的仲胺. 由于 IgG 分子自身也有许多氨基能够与另一 IgG 分子的醛基形成席夫碱，可能会形成自身交联而降低固定化效率，因此更为实用的方法是将醛基化的 IgG 在弱酸性条件下连接到酰肼的表面，此时形成的席夫碱最少，生成的腙键相对于席夫碱也更加稳定，可以满足大多数应用的需要，如果需要，还可以用 $NaCNBH_3$ 将其还原为更加稳定的取代酰肼. Puertas 等[42]采用高碘酸钠氧化法将抗 hCG 抗体固定到 Estapor® 氨基磁性微球上，制备的微球用于侧向免疫层析的检测灵敏度显著高于用 EDC/NHS 固定的抗体.

2.5.2. 亚硼酸连接法

亚硼酸下能与糖基的顺式二醇形成五元环或六元环的硼酸酯，基于这一相互作用，近来有较多用连接有氨基苯硼酸的支持物来定向固定抗体的报道. 尽管亚硼酸与顺式二醇的反应在室温即可进行，但形成的酯在生理条件下不稳定，其他糖蛋白有可能竞争结合亚硼酸导致已固定蛋白的脱落. Adak 等[43]用一种交联剂克服了亚硼酸连接法的这一缺陷. 这种交联剂具有分支结构，分支的一端含有亚硼酸基团，另一端含有光反应性的双吖丙啶（图 3），首先将玻片表面修饰这种双功能交联剂，然后将抗体与亚硼酸基团反应形成硼酸酯使抗体获得正确的空间取向，最后在 365 nm 的紫外光照下活化双吖丙啶形成有活性的碳烯中间体，该中间体与最邻近的抗体侧链形成稳定的共价键.

利用糖基固定抗体的不足之处是抗体的糖基化程度不一，某些单抗糖基化程度低甚至没有糖基化修饰，限制了这种方法的应用.

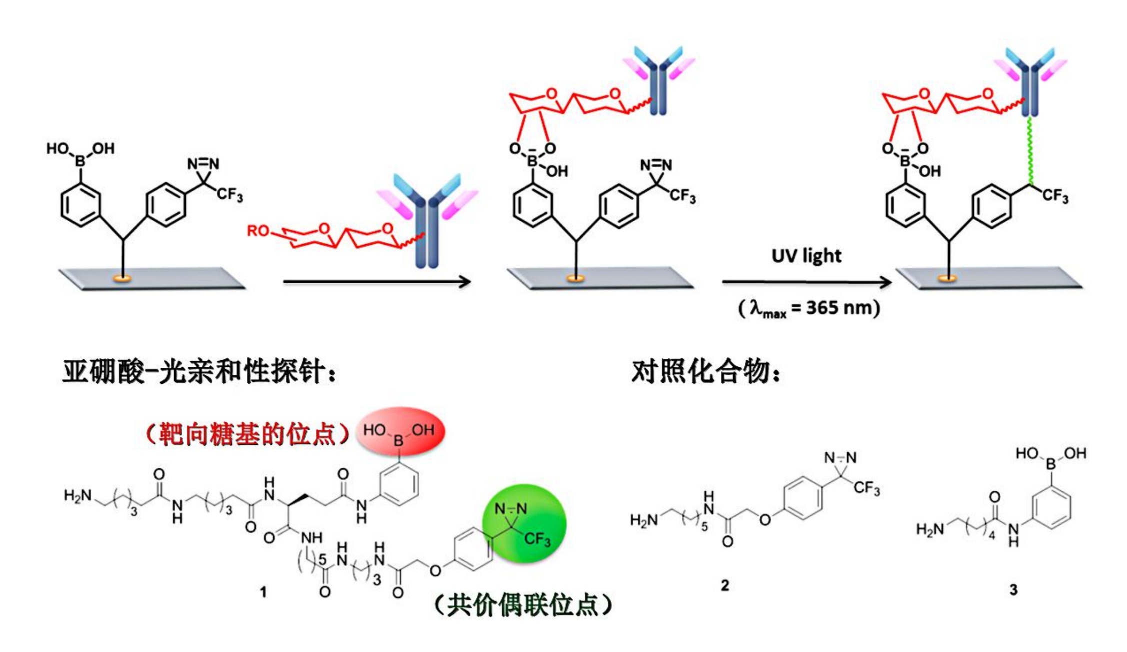


图 3 光反应性探针辅助的亚硼酸连接法用于抗体固定[43]

Fig. 3 Photo affinity probe-assisted BA conjugation for antibody immobilization

2.6. Staudinger 连接固定抗体

Staudinger 连接是 Saxon 等[44]在经典 Staudinger 反应的基础上作出的一种改进形式，反应的发生需要叠氮基和含有膦的酯或硫酯参与. 其反应机理为首先叠氮基和膦结合形成膦亚胺中间体，然后膦亚胺的 N 原子对酯键的 C 发动亲核进攻形成五元环的氨基膦盐，随后五元环水解形成酰胺键. Staudinger 连接在水溶液中发生，反应温和可控，几乎定量生成产物而没有显著的副产物.

Soellner 等[45]首次报道采用 Staudinger 连接固定蛋白，他们以核糖核酸酶 S'作为蛋白模型，先在 15 残基的多肽主链或侧链上引入叠氮基，然后通过 Staudinger 连接固定在末端含有二苯基膦的玻片表面，再将修饰的玻片与核糖核酸酶 S'的残余序列温育，两者结合形成具有催化活性的完整的核糖核酸酶 S'. Staudinger 连接固定蛋白的主要缺点在于需要在蛋白中引入含叠氮基的氨基酸，例如甲硫氨酸类似物(2S)-2-氨基-4-叠氮基丁烷酸[46]，或非天然氨基酸 *p*-叠氮基-L-苯丙氨酸[47]，可能会对蛋白的活性有影响.

2.7. Diels-Alder 反应固定抗体

Diels-Alder 是有机合成中广泛应用的一类经典反应，通常指的是顺式 1,3-二烯底物与另一个双键或三键底物经过环加成反应生成不饱和六元环的反应. 由于 Diels-Alder 反应在水相中比有机相中具有更快的反应速率和更好的立体选择性，因此尤其适用于蛋白质的固定. Shi 等[48]合成了一种可生物降解的接枝共聚物，并用透析法制备成自组装的纳米粒，纳米粒表面含有呋喃基团，然后将 Herceptin 单抗的糖基进行修饰，引入马来酰亚胺基团，最后将纳米粒和马来酰亚胺修饰的抗体在弱酸性缓冲液中 37℃温育反应得到靶向 HER2 过度表达的乳腺癌细胞的免疫纳米粒，这种纳米粒具有用于靶向药物载体的潜能（图 4）.

图 4 通过 Diels-Alder 反应制备 Herceptin 单抗偶联纳米粒[48]

Fig. 4 Preparation of Herceptin monoclonal antibodies conjugated nanoparticles by Diels-Alder reaction

2. 8. 自然化学连接固定抗体

自然化学连接是最早由 Kent 提出的一种用于连接两条多肽链合成蛋白质的方法[49]，其原理是一条多肽链氨基末端的半胱氨酸残基对另一条多肽链末端α-羧基的硫酯进行亲核进攻，形成的硫酯中间体自发重排生成在连接位点处具有一个天然肽键的连接产物.

Reulen 等[50]以增强型黄色荧光蛋白（EYFP）为模型，研究了用自然化学连接将 EYFP 固定到脂质体上的过程. 首先在大肠杆菌中表达带有内含肽和几丁质结合结构域(CBD)的 EYFP 融合蛋白，将 EYFP 融合蛋白结合到几丁质树脂上，然后用巯乙基磺酸钠（MESNA）处理，诱导内含肽自剪切形成 C 末端含有硫酯的 EYFP，最后将含有硫酯的 EYFP 通过自然化学连接固定到表面含有半胱氨酸的脂质体上（图 5）.

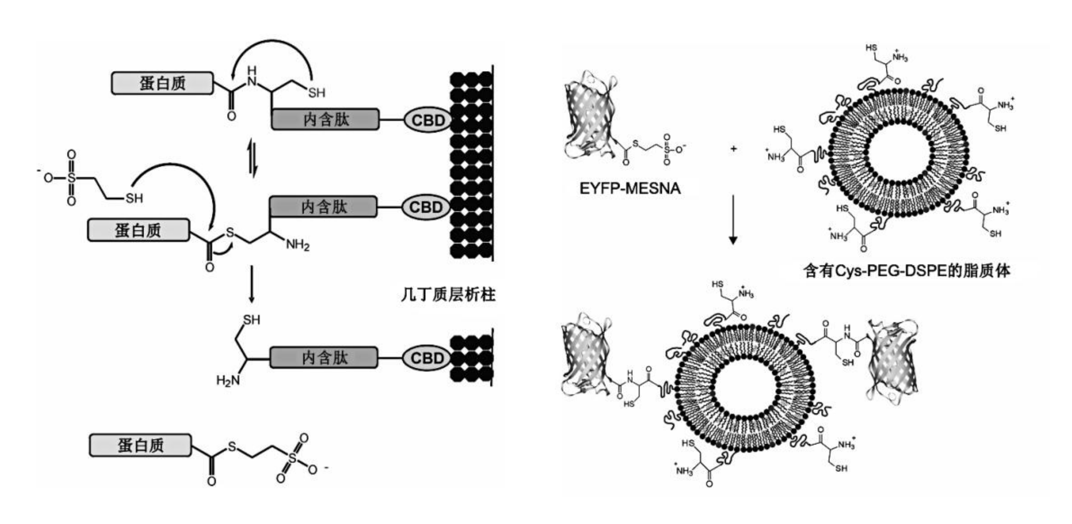


图 5 末端含有硫酯的 EYFP 及连接有 EYFP 的脂质体的制备[50]

Fig. 5 Preparation of thioester-terminated EYFP and EYFP functioned liposomes

2.9. 基于亲和作用的抗体固定

2.9.1. 通过生物素-链霉亲和素的固定

生物素和链霉亲和素具有极强的亲和力（$K_d=10^{-14}$ L/mol），链霉亲和素具有四个生物素结合位点，四个位点两两靠近，使得链霉亲和素可以作为桥连分子将生物素化的蛋白和固相连接在一起. Yang 等[51]采用氨酰 tRNA 合成酶/阻抑 tRNA 和 Avitag/BirA 技术制备了可被光活化的生物素化 Z 结构域（来源于蛋白 A 的 B 结构域，仅与抗体的 F_c 片段结合）突变体，然后在紫外照射下将其与 IgG 交联（图 6），使抗体的 F_c 片段被定向生物素化，与 NHS-biotin 对 IgG 的随机生物素化相比，定向生物素化的 IgG 具有更高的灵敏度.

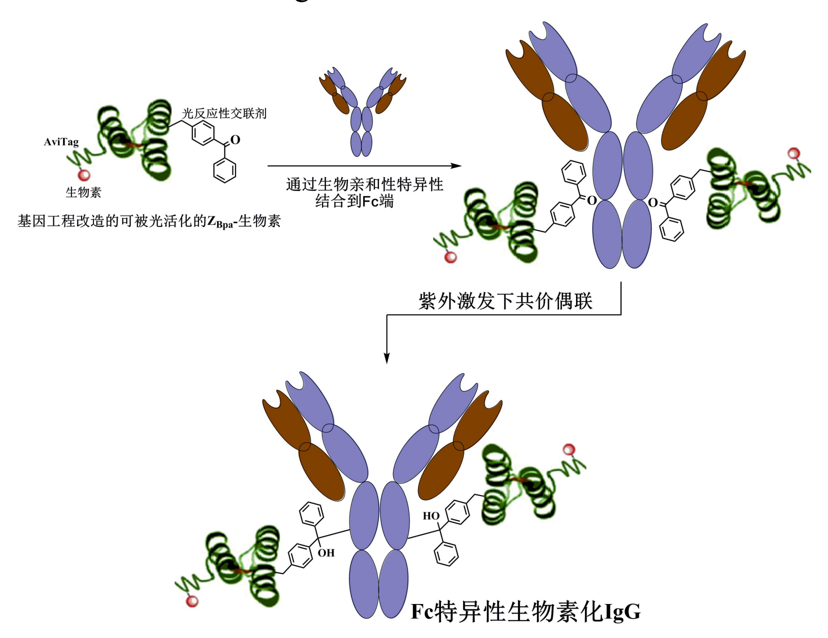


图 6 位点特异性定向共价偶联生物素化 IgG 的策略[51]

Fig. 6 Site-specific and covalent conjugation strategy for IgG biotinylation

2.9.2. 通过蛋白 A 和蛋白 G 的固定

蛋白 A 和蛋白 G 分别是金黄色葡萄球菌和链球菌细胞壁上的一种蛋白成分，与哺乳动物血清中 IgG 具有高度的亲和性，目前这两种蛋白常用于单克隆抗体的亲和层析纯化. 由于蛋白 A 和蛋白 G 结合的是 IgG 的 Fc 端，因此通过蛋白 A 和蛋白 G 为桥连固定的抗体具有 Fab 端游离的空间取向，因此最大程度保留了抗原结合的能力，在一项早期研究中，Schneider 等[52]用先用结合有蛋白 A 的 Sepharose CL-4B 凝胶与目标单抗温育，使单抗通过蛋白 A 结合到凝胶上，然后通过交联剂己二酰亚胺酸二甲酯（Dimethyl adipimidate）将单抗和蛋白 A 化学交联形成稳定的复合物，该复合物在强酸、强碱缓冲液以及含有高浓度表面活性剂中溶液中均有良好的稳定性. 这种亲和基质可用于从细胞裂解物中一步分离目标单抗对应的靶抗原. Soler 等[53]在末端具有烷基硫醇的自组装单层（self-assembled monolayer，SAM）上将蛋白 G 共价固定，然后通过蛋白 G 将待固定的抗体捕获，最后用交联剂双（硫代琥珀酰亚胺）辛二酸酯将蛋白 G 和抗体共价连接.

2.9.3. Fc 结合多肽介导的固定

相对于蛋白 A 或蛋白 G 而言，与抗体 Fc 端具有亲和力的小分子多肽具有更好的灵活性和稳定性，在抗体的固定中也偶有应用. Jung 等[54]将环状多肽通过 PEG 的连接臂固定到羧基葡聚糖的芯片表面，抗 C-反应蛋白（CRP）多克隆抗体通过 Fc 端与多肽的亲和作用间接固定到芯片表面，用这种方式固定的抗体相对于 EDC/NHS 连接固定的抗体，其 CRP 结合能力显著提高.

2.9.4. DNA 介导的固定

基于两条互补的 DNA 链的高度特异性结合，利用 DNA 杂交也可以作为固定蛋白的一种手段，可以根据需要将硫代吡啶基或马来酰亚胺基修饰的寡核苷酸与蛋白的半胱氨酸残基偶联，或将 NHS 修饰的寡核苷酸与蛋白的赖氨酸残基偶联，或者将醛基修饰的寡核苷酸连接到酰肼修饰的抗体上. 在固相表面引入与抗体上寡核苷酸互补配对的反义寡核苷酸链，从而将抗体通过 DNA 的“桥接”固定在固相表面. Seymour 等[55]构建了一种可以检测单个纳米粒子的单颗粒干涉反射成像传感器（single-particle interferometric reflectance imaging sensor），他们利用荧光轴向定位技术对偶联了 DNA 序列的抗体在芯片聚合物的三维表面进行了表征，观察表明 DNA 连接臂显著提高了抗体在三维表面的高度. 他们还用这种芯片对假型水疱性口炎病毒进行了检测，结果表明通过 DNA 固定的抗体达到最大病毒捕获效率时的抗体密度为 0.72 ng/mm^2，而通过常规的 NHS 法直接固定的抗体则为其六倍. Seymour 等认为直接固定的抗体之间存在空间位阻，封闭了部分抗原结合位点，而通过 DNA 固定的抗体由于与聚合物表面的距离增大，空间位阻效应不显著，因此具有更高的抗原捕获效率.

2.9.5. 核苷酸结合位点（nucleotide binding site，NBS）介导的抗体固定

核苷酸结合位点是所有免疫球蛋白分子可变区中的高度保守区域，NBS 序列中富含芳香

族氨基酸，这些芳香氨基酸可以与核苷酸或其他带有侧链苯环的氨基酸发生π-π堆积作用而显示较高的亲和力. Bilgicer 研究组[56]鉴定了一种小分子配体吲哚-3-丁酸（Indole-3-butyric acid，IBA），其与不同亚型抗体的 NBS 具有 K_d 为 1 ~ 8 μM 的亲和力. 他们先将 IBA 的衍生物共价连接到马来酸酐聚合物包被的 96 孔板上，然后 IBA 通过与 NBS 的亲和作用将抗体捕获到微孔板表面，IBA 的苯环和抗体氨基酸侧链的苯环在空间足够接近时，用特定波长（254 nm）的紫外光照激发会产生高活性的自由基，形成将两苯环相连的共价键（图 7）. 进一步研究发现，通过 NBS 固定的抗体比通过氨基固定的抗体和物理吸附固定的抗体均具有更强的抗原的结合能力. 近来，Bilgicer 等[57]又将生物素化和核苷酸结合位点两者结合起来，采用 IBA-EG_{11}-biotin 将抗体 Fab 片段的 NBS 区域定向生物素化，再通过中性亲和素包被的微孔板固定生物素化的 Fab，ELISA 检测的灵敏度显著高于 NHS-biotin 标记的 Fab.

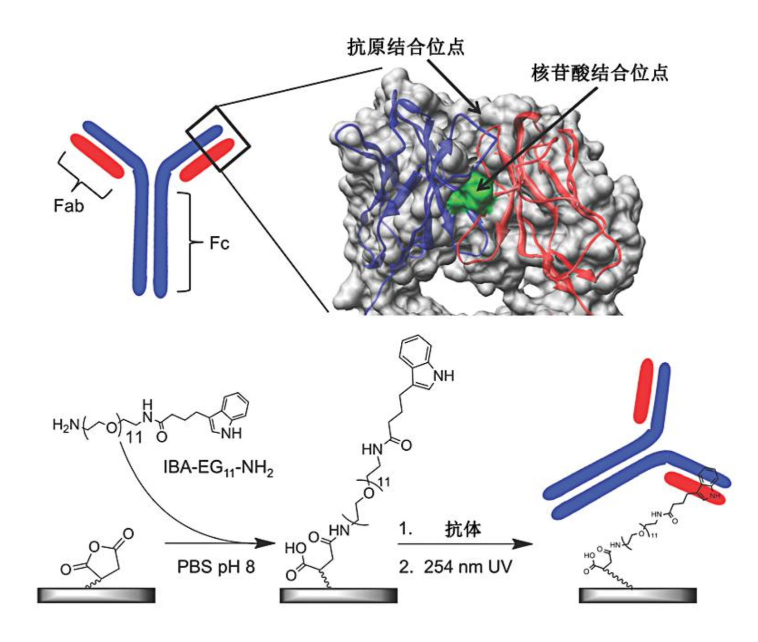


图 7 紫外光辅助下的核苷酸结合位点的抗体固定[56]

Fig. 7 Site-specific immobilization of antibodies via UV-assisted binding at the nucleotide binding site

2.9.6. 基于金属螯合作用的抗体固定

多聚组氨酸标签是目前重组蛋白中最常用的标签之一，由于多聚组氨酸在多种条件下都可以结合到过渡金属离子 Ni^{2+}、Co^{2+}等固定化的金属离子上，因此这些金属离子常用于亲和纯化带有多聚组氨酸标签的融合蛋白. Baio 等[58]用 Ni^{2+}螯合的次氮基三乙酸（NTA）作为配体，将带有多聚组氨酸标签的重组抗体固定在支持物上. 虽然 Ni^{2+}对多聚组氨酸有较强的亲和力，但这种结合是可逆的，在含有组氨酸簇的其他蛋白存在下，可能造成已固定抗体的脱落. Ericsson 等[59]对这一缺陷进行了改进. 他们在 Ni-NTA 的 SAM 表面引入了光反应性交联剂二苯甲酮，先通过 Ni^{2+}将 F_c 端含有组氨酸标签的人 IgG 捕获到 SAM 表面，然后二苯甲酮在 360 nm 紫外光激发下对 IgG 上的 C-H、O-H 或 N-H 键进行进攻，生成新键（图 8）.

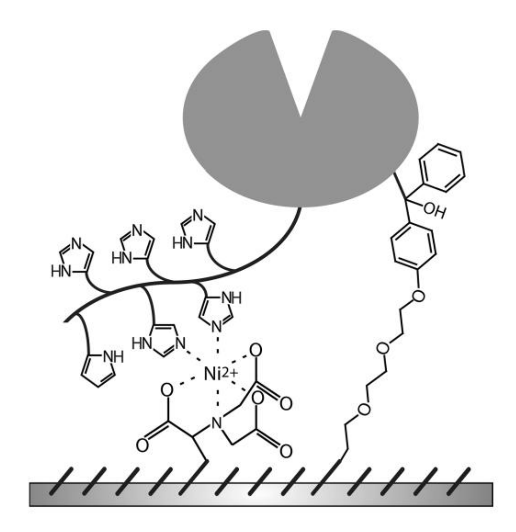


图 8 紫外光辅助下基于金属螯合的抗体固定[59]

Fig. 8 Photo-assisted antibody immobilization via metal chelation

除 Ni 以外，还有 Cr(III)用于固定抗体的报道，Welch 等[60]采用高氯酸铬和乙二胺的配制成的水溶液修饰微孔板表面，然后将抗体通过金属配合物为桥连固定在微孔板上，与未经 Cr(III)修饰的表面相比，其抗原检测限有了数量级的提高.

2.10. 固定化抗体的表征

免疫分析是最常用于评价固定化抗体状态的方法，因为它代表了固定抗体的实际应用. 无论是传统的 ELISA 还是磁微粒化学发光免疫分析，都要求固定的抗体具有正确的取向、天然的构象以及在固相表面上足够的密度. 而通过免疫分析作为一种间接的功能性分析方法，只能根据测定结果对抗体的状态和取向进行推断，因此研究人员发展了其他独立的补充分析方法对固定化的抗体进行表征. 这些分析手段有 X 射线光电子能谱（X-Ray photoelectron spectroscopy，XPS）、椭圆偏振光谱（Spectroscopic Ellipsometry，SE）、双偏振干涉分子相互作用（Dual polarization interferometry，DPI）、SPR、NR、AFM、石英晶体微天平（Quartz crystal microbalance，QCM）、飞行时间二次离子质谱（Time-of-flight secondary-ion mass spectrometry，ToF-SIMS）等（表 1）. 大部分分析手段都只针对固定蛋白的密度进行定量，而能对抗体的取向进行探测的手段则很有限[4].

表 1 应用于抗体偶联与固相表面的分析技术

Table 1 Application of surface analysis techniques for immobilized antibody

技术方法	输入	输出	信息	应用
XPS[60, 61]	单色 X 光射线	光电子	元素和化学成分	定量载体表面抗体的密度
SE[62, 63]	椭圆偏振光	光的相位和强度的变化	厚度、折射率、表面粗糙度	模式化分析、推断抗体形态
DPI[64, 65]	激光	衰逝波的变化	质量、膜厚度、折射率、密度	通过质量和膜厚度推断抗体形态
SPR[66, 67]	多角度单色激光	反射光和吸收光的变化	折射率、膜厚度	通过抗体和抗原的光吸收特性推断其形态

NR[68, 69]	中子束	中子束反射后角度和波长的变化	折射率、膜厚度、表面粗糙度	模式化分析、推断抗体形态
AFM[70-73]	反馈驱动悬臂式纳米尖端	抗体在载体表面的高度、表面张力	表面粗糙度、相位信息、图像	精确定位高于载体表面 14nm 的抗体
QCM[74, 75]	微量天平的共振频率	频率和振幅的变化	质量吸收系数、生物亲和性	通过压电石英晶体对抗体的吸收性和质量推断抗体形态
ToF-SIMS[76, 77]	电离金属簇，“一级离子”	电离片段，“二级离子”	元素半定量、化学成分、分子量	分辨 $F(ab')_2$ 和 Fc 片段氨基酸的种类和数量

3　展望

抗体的固定在免疫分析的应用中具有关键作用. 在固定过程中最大程度保留抗体的活性、使抗体在固相表面有正确的空间取向和合理的空间密度是抗体固定化方法需要达到的目标. 由于每一种抗体 Fab 区域序列和物理化学性质都有很强的变异性，固相表面自身的性质也由于材料的不同而不同，因此很难针对找到一种定向固定抗体的通用方法，但作为固定方法本身需要具有以下特点：（1）反应条件温和，不破坏抗体的天然构象；（2）固定的抗体需要具有尽可能一致的空间取向，使抗原结合位点尽量远离固相表面；（3）固定化工艺的重复性好，利于放大. 随着基因工程抗体技术研究的不断深入，使得重组抗体的某一特定氨基酸位点的定向突变成为可能，因此基于特异性位点的定向偶联技术则可能是未来抗体固定技术的一个发展方向.

参 考 文 献

[1] Yu Q, Wang Q, Li B, et al. Technological Development of Antibody Immobilization for Optical Immunoassays: Progress and Prospects. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2014, 45(1): 62-75.

[2] Liu Y, Li C M. Advanced Immobilization and Amplification for High Performance Protein Chips. Analytical Letters, 2012, 45(2-3): 130-155.

[3] Wujcik E K, Wei H, Zhang X, et al. Antibody nanosensors: a detailed review. RSC Adv, 2014, 4(82): 43725-43745.

[4] Welch N G, Scoble J A, Muir B W, et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). Biointerphases, 2017, 12(2): 02D301-13.

[5] Trilling A K, Beekwilder J, Zuilhof H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. Analyst, 2013, 138(6): 1619-1627.

[6] Hoehne M, Samuel F, Dong A, et al. Adsorption of monoclonal antibodies to glass microparticles. J Pharm Sci, 2011, 100(1): 123-132.

[7] Low S C, Shaimi R, Thandaithabany Y, et al. Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 110: 248-253.

[8] Shen H, Tauzin L J, Wang W, et al. Single-Molecule Kinetics of Protein Adsorption on Thin Nylon-6,6 Films. Anal Chem, 2016, 88(20): 9926-9933.

[9] Daraee H, Eatemadi A, Abbasi E, et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016, 44(1): 410-422.

[10] Qian W, Yao D, Yu F, et al. Immobilization of antibodies on ultraflat polystyrene surfaces. Clin Chem, 2000, 46(9): 1456-1463.

[11] Wang Z, Huang Y, Li S, et al. Hydrophilic modification of polystyrene with hydrophobin for time-resolved immunofluorometric assay. Biosens Bioelectron, 2010, 26(3): 1074-1079.

[12] Xu H, Zhao X, Grant C, et al. Orientation of a Monoclonal Antibody Adsorbed at the Solid/Solution Interface: A Combined Study Using Atomic Force Microscopy and Neutron Reflectivity. Langmuir, 2006, 22(14): 6313-6320.

[13] Zeliszewska P, Wasilewska M, Adamczyk Z. Monolayers of immunoglobulin G on polystyrene microparticles and their interactions with human serum albumin. J Colloid Interface Sci, 2017, 490: 587-597.

[14] Sun Y, Du H, Feng C, et al. Oriented immobilization of antibody through carbodiimide reaction and controlling electric field. Journal of Solid State Electrochemistry, 2015, 19(10): 3035-3043.

[15] Yang J, Gao P, Liu Y, et al. Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A. Biosens Bioelectron, 2015, 64: 13-18.

[16] Booth M A, Partridge A, Wu Y. Investigating a Functionalized Terthiophene Surface for the Detection of Progesterone Using Surface Plasmon Resonance. International Journal of Electronics and Electrical Engineering, 2016, 181-184.

[17] Sam S, Touahir L, Salvador Andresa J, et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. Langmuir, 2010, 26(2): 809-814.

[18] Vashist S K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. Diagnostics (Basel), 2012, 2(3): 23-33.

[19] Raghav R, Srivastava S. Immobilization strategy for enhancing sensitivity of immunosensors: L-Asparagine-AuNPs as a promising alternative of EDC-NHS activated citrate-AuNPs for antibody immobilization. Biosens Bioelectron, 2016, 78: 396-403.

[20] Zhao M, Li H, Liu W, et al. Plasma treatment of paper for protein immobilization on paper-based chemiluminescence immunodevice. Biosens Bioelectron, 2016, 79: 581-588.

[21] Gunda N S K, Singh M, Norman L, et al. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. Applied Surface Science, 2014, 305: 522-530.
[22] Wasserberg D, Nicosia C, Tromp E E, et al. Oriented protein immobilization using covalent and noncovalent chemistry on a thiol-reactive self-reporting surface. J Am Chem Soc, 2013, 135(8): 3104-3111.
[23] Wacker R, Schroder H, Niemeyer C M. Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study. Anal Biochem, 2004, 330(2): 281-287.
[24] Gauvreau V, Chevallier P, Vallières K, et al. Engineering Surfaces for Bioconjugation: Developing Strategies and Quantifying the Extent of the Reactions. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(5): 1146-1156.
[25] Patterson J T, Gros E, Zhou H, et al. Chemically generated IgG2 bispecific antibodies through disulfide bridging. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(16): 3647-3652.
[26] Liu G, Shi G, Sheng H, et al. Doubly Caged Linker for AND-Type Fluorogenic Construction of Protein/Antibody Bioconjugates and In Situ Quantification. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56(30): 8686-8691.
[27] Levengood M R, Zhang X, Hunter J H, et al. Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody–Drug Conjugates. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(3): 733-737.
[28] Thompson E A. Production of antibodies for specific detection of dengue virus-2 by surface enhanced Raman spectroscopy. Honors Theses, 2017, 474.
[29] Zwyssig A, Schneider E M, Zeltner M, et al. Protein Reduction and Dialysis-Free Work-Up through Phosphines Immobilized on a Magnetic Support: TCEP-Functionalized Carbon-Coated Cobalt Nanoparticles. Chemistry, 2017, 23(36): 8585-8589.
[30] Ichihara T, Akada J K, Kamei S, et al. A Novel Approach of Protein Immobilization for Protein Chips Using an Oligo-Cysteine Tag. Journal of Proteome Research, 2006, 5(9): 2144-2151.
[31] Blank K, Morfill J, Gaub H E. Site-specific immobilization of genetically engineered variants of Candida antarctica lipase B. Chembiochem, 2006, 7(9): 1349-1351.
[32] Camarero J A. NEW DEVELOPMENTS FOR THE SITE-SPECIFIC ATTACHMENT OF PROTEIN TO SURFACES. Biophysical Reviews and Letters, 2006, 01(01): 1-28.
[33] Camarero J A, Cotton G J, Adeva A, et al. Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support. J Pept Res, 1998, 51(4): 303-316.
[34] Biju V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. Chem Soc Rev, 2014, 43(3): 744-764.
[35] Steen Redeker E, Ta D T, Cortens D, et al. Protein engineering for directed immobilization. Bioconjug Chem, 2013, 24(11): 1761-1777.
[36] Houseman B T, Gawalt E S, Mrksich M. Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. Langmuir, 2003, 19(5): 1522-1531.
[37] Tuci G, Luconi L, Rossin A, et al. Aziridine-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes: Robust and Versatile Catalysts for the Oxygen Reduction Reaction and Knoevenagel Condensation. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(44): 30099-30106.
[38] Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angewandte Chemie International Edition, 2001, 40(11): 2004-2021.
[39] Finetti C, Sola L, Pezzullo M, et al. Click Chemistry Immobilization of Antibodies on Polymer Coated Gold Nanoparticles. Langmuir, 2016, 32(29): 7435-7441.
[40] Trilling A K, Hesselink T, Van Houwelingen A, et al. Orientation of llama antibodies strongly increases sensitivity of biosensors. Biosens Bioelectron, 2014, 60: 130-136.
[41] Wolfe C a C, Hage D S. Studies on the Rate and Control of Antibody Oxidation by Periodate. Analytical

Biochemistry, 1995, 231(1): 123-130.
[42] Puertas S, Moros M, Fernández-Pacheco R, et al. Designing novel nano-immunoassays: antibody orientation versus sensitivity. Journal of Physics D: Applied Physics, 2010, 43(47): 474012.
[43] Adak A K, Li B Y, Huang L D, et al. Fabrication of antibody microarrays by light-induced covalent and oriented immobilization. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(13): 10452-10460.
[44] Saxon E, Bertozzi C R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. Science, 2000, 287(5460): 2007-2010.
[45] Soellner M B, Dickson K A, Nilsson B L, et al. Site-Specific Protein Immobilization by Staudinger Ligation. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(39): 11790-11791.
[46] Kohn M. Immobilization strategies for small molecule, peptide and protein microarrays. J Pept Sci, 2009, 15(6): 393-397.
[47] Bundy B C, Swartz J R. Site-Specific Incorporation of p-Propargyloxyphenylalanine in a Cell-Free Environment for Direct Protein−Protein Click Conjugation. Bioconjugate Chemistry, 2010, 21(2): 255-263.
[48] Shi M, Wosnick J H, Ho K, et al. Immuno-polymeric nanoparticles by Diels-Alder chemistry. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(32): 6126-6131.
[49] Dawson P, Muir T, Clark-Lewis I, et al. Synthesis of proteins by native chemical ligation. Science, 1994, 266(5186): 776-779.
[50] Reulen S W A, Brusselaars W W T, Langereis S, et al. Protein−Liposome Conjugates Using Cysteine-Lipids And Native Chemical Ligation. Bioconjugate Chemistry, 2007, 18(2): 590-596.
[51] Yang H M, Bao R M, Yu C M, et al. Fc-specific biotinylation of antibody using an engineered photoactivatable Z-Biotin and its biosensing application. Anal Chim Acta, 2017, 949: 76-82.
[52] Schneider C, Newman R A, Sutherland D R, et al. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(18): 10766-10769.
[53] Soler M, Estevez M C, Alvarez M, et al. Direct detection of protein biomarkers in human fluids using site-specific antibody immobilization strategies. Sensors (Basel), 2014, 14(2): 2239-2258.
[54] Jung Y, Kang H J, Lee J M, et al. Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide. Anal Biochem, 2008, 374(1): 99-105.
[55] Seymour E, Daaboul G G, Zhang X, et al. DNA-Directed Antibody Immobilization for Enhanced Detection of Single Viral Pathogens. Anal Chem, 2015, 87(20): 10505-10512.
[56] Alves N J, Kiziltepe T, Bilgicer B. Oriented surface immobilization of antibodies at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection. Langmuir, 2012, 28(25): 9640-9648.
[57] Mustafaoglu N, Alves N J, Bilgicer B. Site-specific fab fragment biotinylation at the conserved nucleotide binding site for enhanced Ebola detection. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(7): 1327-1334.
[58] Baio J E, Cheng F, Ratner D M, et al. Probing orientation of immobilized humanized anti-lysozyme variable fragment by time-of-flight secondary-ion mass spectrometry. J Biomed Mater Res A, 2011, 97(1): 1-7.
[59] Ericsson E M, Enander K, Bui L, et al. Site-specific and covalent attachment of his-tagged proteins by chelation assisted photoimmobilization: a strategy for microarraying of protein ligands. Langmuir, 2013, 29(37): 11687-11694.
[60] Welch N G, Scoble J A, Easton C D, et al. High-Throughput Production of Chromium(III) Complexes for Antibody Immobilization. Analytical Chemistry, 2016, 88(20): 10102-10110.
[61] Welch N G, Easton C D, Scoble J A, et al. A chemiluminescent sandwich ELISA enhancement method using a chromium (III) coordination complex. Journal of Immunological Methods, 2016, 438(Supplement C): 59-66.
[62] Ray S, Mehta G, Srivastava S. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges. Proteomics, 2010, 10(4): 731-748.
[63] Balevicius Z, Ramanaviciene A, Baleviciute I, et al. Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 160(1): 555-562.

[64] Song H Y, Hobley J, Su X, et al. End-on Covalent Antibody Immobilization on Dual Polarization Interferometry Sensor Chip for Enhanced Immuno-sensing. Plasmonics, 2014, 9(4): 851-858.
[65] Escorihuela J, Gonzalez-Martinez M A, Lopez-Paz J L, et al. Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. Chem Rev, 2015, 115(1): 265-294.
[66] Mauriz E, García-Fernández M C, Lechuga L M. Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016, 79(Supplement C): 191-198.
[67] Zhang J, Sun Y, Wu Q, et al. A protein A modified Au-graphene oxide composite as an enhanced sensing platform for SPR-based immunoassay. Analyst, 2013, 138(23): 7175-7181.
[68] Zhao X, Pan F, Garcia-Gancedo L, et al. Interfacial recognition of human prostate-specific antigen by immobilized monoclonal antibody: effects of solution conditions and surface chemistry. J R Soc Interface, 2012, 9(75): 2457-2467.
[69] Schneck E, Berts I, Halperin A, et al. Neutron reflectometry from poly (ethylene-glycol) brushes binding anti-PEG antibodies: Evidence of ternary adsorption. Biomaterials, 2015, 46(Supplement C): 95-104.
[70] Funari R, Della Ventura B, Altucci C, et al. Single Molecule Characterization of UV-Activated Antibodies on Gold by Atomic Force Microscopy. Langmuir, 2016, 32(32): 8084-8091.
[71] Coppari E, Santini S, Bizzarri A R, et al. Kinetics and binding geometries of the complex between β2-microglobulin and its antibody: An AFM and SPR study. Biophysical Chemistry, 2016, 211(Supplement C): 19-27.
[72] Vilhena J G, Dumitru A C, Herruzo E T, et al. Adsorption orientations and immunological recognition of antibodies on graphene. Nanoscale, 2016, 8(27): 13463-13475.
[73] Marciello M, Filice M, Olea D, et al. Useful oriented immobilization of antibodies on chimeric magnetic particles: direct correlation of biomacromolecule orientation with biological activity by AFM studies. Langmuir, 2014, 30(49): 15022-15030.
[74] Deng X, Chen M, Fu Q, et al. A Highly Sensitive Immunosorbent Assay Based on Biotinylated Graphene Oxide and the Quartz Crystal Microbalance. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(3): 1893-1902.
[75] Akter R, Rhee C K, Rahman M A. A highly sensitive quartz crystal microbalance immunosensor based on magnetic bead-supported bienzymes catalyzed mass enhancement strategy. Biosens Bioelectron, 2015, 66: 539-546.
[76] Foster R N, Harrison E T, Castner D G. ToF-SIMS and XPS Characterization of Protein Films Adsorbed onto Bare and Sodium Styrenesulfonate-Grafted Gold Substrates. Langmuir, 2016, 32(13): 3207-3216.
[77] Welch N G, Madiona R M T, Payten T B, et al. Surface Adsorbed Antibody Characterization Using ToF-SIMS with Principal Component Analysis and Artificial Neural Networks. Langmuir, 2016, 32(34): 8717-8728.